

УРОВЕНЬ ГЕМОКСИГЕНАЗ КАК ПОКАЗАНИЕ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИКРОБИОМА ЭНДОМЕТРИЯ У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

Ю.А. Лызикова

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Реферат

Использование метода ампликонного секвенирования гипервариабельной 16S области рибосомной РНК позволило выявить сложный и разнообразный состав микробиома эндометрия у пациенток с хроническим эндометритом. Так как у пациенток группы сравнения полость матки также нестерильна, целью исследования было определение показаний для назначения противовоспалительной терапии пациенткам с хроническим эндометритом. Показанием для терапии являются уровни гемоксигеназы в крови: HO-1 >0,250 нг/мл; HO-2 >0,115 нг/мл ($p=0,001$).

Ключевые слова: хронический эндометрит, микробиом, секвенирование 16spРНК, гемоксигеназа-1, гемоксигеназа-2.

THE LEVEL OF HEMOXYGENASE AS AN INDICATION FOR THE CORRECTION OF THE ENDOMETRIAL MICROBIOME IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS

Yu. A. Lyzikova

Educational institution "Gomel State Medical University"

Abstract

Using the method of complex sequencing of the hypervariable 16S region of ribosomal RNA it was possible to identify the complex composition of the endometrial microbiome in patients with chronic endometritis. Since the uterine cavity in the comparison group is also not sterile the aim of the study was to determine the indications for the anti-inflammatory therapy in patients with chronic endometritis. Indications for therapy are the levels of hemoxygenase in the blood: HO- 1 >0.250 ng/ml; HO-2 >0.115 ng/ml ($p = 0.001$).

Key words: chronic endometritis, microbiome, 16spRNA sequencing, hemoxygenase-1, hemoxygenase-2.

Введение

В настоящее время отмечается увеличение количества хронических воспалительных заболеваний внутренних половых органов у женщин, и, в особенности, хронического эндометрита [1]. Частота хронического эндометрита колеблется, по данным разных авторов, от 2,6 до 71%, и она выше у пациенток с репродуктивными нарушениями [2, 3].

В связи с высокой распространенностью заболевания у пациенток с репродуктивными нарушениями представляет интерес изучение

микробиома полости матки у данных пациенток с целью его коррекции. Изучение микробиоты матки и ее влияние на репродуктивную функцию женщины являются предметом исследований последних лет. Однако, большая часть работ, описывающих микробиом репродуктивного тракта, основана на культуральных методах диагностики. Культурально-зависимая характеристика микробного сообщества связана с ограничениями, поскольку среди выявляемых микроорганизмов доминируют быстрорастущие аэробные виды, оставляя незамеченными редкие

виды, требующие определенных условий культивирования [4, 5, 6].

Вместо оценки присутствия определенного вида бактерий при культуральном исследовании ампликонное секвенирование гипервариабельной 16S области рибосомной РНК позволяет идентифицировать все виды микроорганизмов, присутствующих в образце.

Метагеномно-молекулярный подход секвенирования 16S рНК позволяет получить более полное представление, отражающее разнообразие и относительное обилие микробиоты. Метод не является количественным, однако дает возможность провести видовую идентификацию микробных сообществ. Использование метода диагностики с помощью секвенирования фрагмента гена 16S рНК позволило обнаружить микробиоту с низкой биомассой, что перевернуло представление о том, что матка действительно может быть нестерильным органом [6, 7]. Однако, нельзя игнорировать тот факт, что секвенирование 16S рНК не дифференцирует живые бактерии или бактериальные фрагменты. Учитывая вышеизложенное, необходим поиск маркеров воспалительного ответа на сложный микробиом эндометрия для определения показаний к противовоспалительному лечению.

Окислительный стресс, вызванный раздражителями, например, гипоксия, гипероксия и ишемия, липополисахариды, активируют экспрессию гемоксигеназы (НО). Гемоксигеназа экспрессируется в двух изоформах, гемоксигеназа-1 (НО-1) и гемоксигеназа-2 (НО-2). Гемоксигеназа 1 разлагает гем на биливердин, свободное железо и монооксид углерода (СО). Биливердин восстанавливается до билирубина с антиоксидантными свойствами, тогда как СО обладает антиапоптотическими свойствами. Из всех продуктов распада гема СО, по-видимому, является самым важным в регуляции иммунной системы, он снижает выработку провоспалительных цитокинов и одновременно увеличивает продукцию противовоспалительных. Монооксид углерода влияет на передачу сигналов от определенных Toll-подобных рецепторов, то есть участвует в иницировании иммунного ответа.

Также установлено, что НО-1 может напрямую регулировать экспрессию цитокинов [8]. Таким образом, гемоксигеназа участвует в нескольких биологических процессах, регулирующих окислительный стресс, апоптоз, и воспаление [9, 10].

Цель исследования

Определить уровни гемоксигеназы (НО-1, НО-2) у пациенток с хроническим эндометритом, микробиологический состав эндометрия которых изучался методом секвенирования 16SpРНК.

Материал и методы исследования

Обследовано 128 пациенток репродуктивного возраста. Всем пациенткам на 21-22 день менструального цикла проведена аспирационная биопсия эндометрия с помощью аспирационной кюретки Profi Combi (Симург, Беларусь). По результатам иммуногистохимического и гистологического исследования эндометрия, пациентки разделены на 2 группы: основную составила 91 (71,09%) пациентка с хроническим эндометритом, группу сравнения – 37 (28,91%) пациенток с нормальным эндометрием. Диагноз хронический эндометрит выставлялся по результатам иммуногистохимического исследования с определением экспрессии: CD 56, Fox P3, CD 138, CD 68, CD 86, ER, PR. У пациенток обеих групп микробиом эндометрия изучен с помощью метода секвенирования 16spРНК.

Концентрацию гемоксигеназы-1 (Heme Oxygenase 1) в плазме крови пациенток определяли методом ИФА с применением микропланшетного фотометра «SunriseTecan» (Австрия), используя набор реагентов «Heme Oxygenase 1 ELISA Kit» (производства Elabscience, Китай) согласно инструкции производителя (диапазон обнаружения 0,31-20 нг/мл, чувствительность 0,19 нг/мл). Концентрацию гемоксигеназы-2 (Heme Oxygenase 2) в плазме крови пациенток определяли методом ИФА с применением микропланшетного фотометра «SunriseTecan» (Австрия), используя набор реагентов «Heme Oxygenase 2 ELISA Kit» (производства Elabscience, Китай) согласно инструкции производителя (диапазон обнаружения 0,16-10 нг/мл, чувствительность 0,10 нг/мл).

Результаты представлены в виде медианы (Me), в качестве квартильной оценки – нижний (0,25) и верхний квартили. Результаты представлены в виде (0,25; 0,75). Анализ данных проводился с прикладных программных пакетов «Statistica 10.0», «MedCalc 10.2.00». При сравнительном анализе рядов переменных, выраженных в интервальных шкалах, не имеющих нормального распределения, использовали Манна-Уитни U-тест. При анализе качественных признаков в группах сравнения использовали непараметри-

ческий критерий Фишера. Оценку статистической значимости показателей считали достоверной при $p < 0,05$. Графики выполнены с использованием программы GraphPadPRISM 8.0.1.

Результаты и обсуждение

Обследовано 128 пациенток репродуктивного возраста, 91 (71,09%) пациентка основной группы и 37 (28,91%) пациенток группы сравнения. Пациентки были сопоставимы по возрасту, в основной группе возраст составил 31,00 (28,25; 35,75) лет, в группе сравнения – 29,00 (25,00; 33,50) ($p = 0,126$).

Среди обследованных методом секвенирования 16spPНК пациенток основной группы у 68 (74,73%) было бесплодие. В группе сравнения бесплодие было у 12 (32,43%) пациенток ($\chi^2 = 30,80$, $p < 0,001$). Вспомогательные репродуктивные технологии применяли 2 (5,41%) пациентки группы сравнения и 10 (10,91%) пациенток основной группы ($\chi^2 = 0,48$, $p = 0,517$). Следует отметить, что у 2 (5,41%) пациенток группы сравнения была одна неэффективная попытка ЭКО, в основной группе у 4 (4,40%) пациенток было две попытки, у 2 (2,20%) пациенток – три попытки, у 3 (3,30%) – четыре, и у 1 (1,10%) – семь. В основной группе у 15 (16,48%) пациенток была замершая беременность в анамнезе, у 11 (12,09%) пациенток – невынашивание беременности. С одинаковой частотой – 1 (2,70%) среди пациенток группы сравнения встречались замершая беременность и антенатальная гибель плода. Таким образом, хронический эндометрит ассоциирован с бесплодием ($\chi^2 = 30,80$, $p < 0,001$), при сравнении другой патологии репродукции не было получено значимых различий между группами.

Жалобы предъявляли 11 (29,73%) пациенток группы сравнения: хронические тазовые боли были у 4 (10,81%) пациенток, нерегулярные менструации – у 5 (13,51%). С одинаковой частотой – 1 (2,70%) встречались жалобы на обильные выделения из половых путей и болезненные менструации. В основной группе жалобы различного характера были у 24 (26,37%) пациенток: 9 (9,8%) женщин беспокоили нерегулярные менструации, 10 (10,99%) – тазовые боли, 4 (4,40%) – обильные выделения из половых путей, 1 (1,10%) – скудные менструации. Таким образом, частота жалоб была сопоставима у пациенток обеих групп и по структуре значимо не различалась. В анамнезе у 11 (29,73%) пациенток группы сравнения и у 44 (48,35%) основной группы были беременности с

различным исходом ($\chi^2 = 3,0$, $p = 0,083$). При сравнении исходов беременностей у пациенток обеих групп статистически значимых различий не было.

Путем секвенирования участков гена 16S рPНК определен генетический материал микроорганизмов в полости матки у 34 (91,89%) пациенток без хронического эндометрита и у 83 (91,21%) пациенток основной группы ($p = 0,72$). Таким образом, у большинства пациенток обеих групп эндометрий не является стерильным. У 26 (70,27%) пациенток группы сравнения в полости матки определен один вид микроорганизмов, у 5 (13,51%) – сочетание двух видов, у 2 (5,41%) – сочетание трех. Сочетание четырех и более видов микроорганизмов выявлено у 1 (2,70%) пациентки без хронического эндометрита. Среди пациенток основной группы один вид микроорганизмов в полости матки выделен у 14 (15,38%), два вида – у 11 (12,09%), три вида – у 12 (13,19%). Сочетание четырех и более видов микроорганизмов выявлено у 43 (47,25%). Таким образом, у большинства пациенток группы сравнения выделен один вид микроорганизмов ($\chi^2 = 29,11$, $p < 0,001$), в основной группе у 45 (52,75%) определено сочетание четырех и более микроорганизмов ($\chi^2 = 21,21$, $p < 0,001$). В составе микробиома полости матки у пациенток с хроническим эндометритом значимо чаще определялись: *Dialister* spp. – в 21 (23,08%) случае ($\chi^2 = 6,31$; $p = 0,012$); *Leptotrichia* spp. – у 18 (19,78%) пациенток ($\chi^2 = 6,96$; $p = 0,008$), *Porphyromonas* spp. – в 19 (20,88%) случаях ($\chi^2 = 7,50$; $p = 0,006$); *Prevotella* spp. – у 23 (25,27%) пациенток ($\chi^2 = 7,83$; $p = 0,006$) [7].

Использование метода секвенирования 16 spPНК для диагностики микробиома матки позволило определить широкий видовой спектр микроорганизмов у пациенток с хроническим эндометритом. Полученные данные показали, что полость матки не является стерильной у пациенток обеих групп. Однако, у пациенток без хронического эндометрита микробиом характеризуется преобладанием одного вида микроорганизмов, в отличие от пациенток основной группы. Учитывая полученные данные, возникла необходимость исследовать, являются ли данные микроорганизмы у пациенток с хроническим эндометритом частью микробиома, или они потенцируют воспаление. Для определения ответа макроорганизма на наличие бактерий в полости матки определены концентрации гемоксигеназы 1 и гемоксигеназы 2 в сыворотке крови.

В основной группе концентрация гемоксигеназы 1 (НО-1) составила 0,356 (0,246;

0,543) нг/мл, в группе сравнения – 0,205 (0,141; 0,335) нг/мл ($z = -2,99$, $p = 0,002$) (рис. 1).

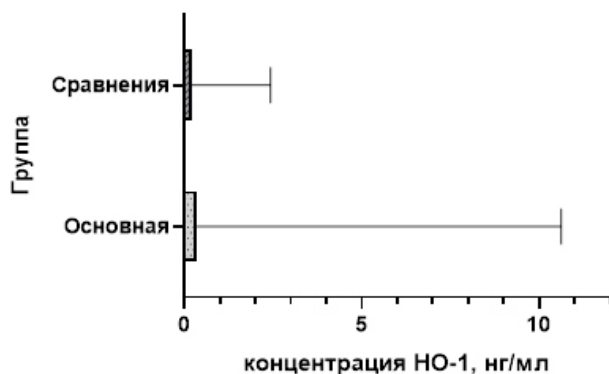


Рисунок 1. Уровень гемоксигеназы 1 у пациенток с хроническим эндометритом

С целью оценки диагностической значимости исследования НО-1 у пациенток с хроническим эндометритом проведен ROC-анализ. При проведении ROC-анализа были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,001$), AUC составила 0,706 (95% ДИ 0,599–0,798), значимым для развития хронического эндометрита является уровень НО-1 $>0,250$ нг/мл, отношение правдоподобия для положительного результата составляет 2,03 (чувствительность – 73,02%, специфичность – 64,00%, +PV – 83,60%; -PV – 48,50%).

В основной группе концентрация гемоксигеназы 2 (НО-2) составила 0,180 (0,123; 0,273) нг/мл, в группе сравнения – 0,102 (0,052; 0,190) нг/мл ($z = -3,12$, $p = 0,001$) (Рис. 2).

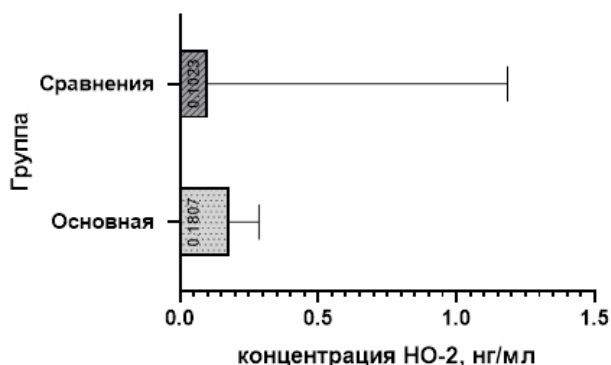


Рисунок 2. Уровень гемоксигеназы 2 у пациенток с хроническим эндометритом

С целью оценки диагностической значимости исследования НО-2 у пациенток с хроническим эндометритом проведен ROC-анализ. При проведении ROC-анализа были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,001$), AUC составила 0,715 (95% ДИ 0,609 – 0,806), значимым для

развития хронического эндометрита является уровень НО-2 $>0,115$ нг/мл, отношение правдоподобия для положительного результата составляет 2,16 (чувствительность – 77,78%, специфичность – 64,00%, +PV – 84,50%; -PV – 53,30).

Таким образом, у пациенток с хроническим эндометритом сложный состав микробиома эндометрия характеризуется развитием воспаления, что требует проведения лечебных мероприятий.

Выводы

1. У пациенток с хроническим эндометритом концентрация гемоксигеназ достоверно выше, концентрация НО-1 составила 0,356 (0,246; 0,543) нг/мл, в группе сравнения – 0,205 (0,141; 0,335) нг/мл ($z = -2,99$, $p = 0,002$), концентрация НО-2 составила 0,180 (0,123; 0,273) нг/мл, в группе сравнения – 0,102 (0,052; 0,190) нг/мл ($z = -3,12$, $p = 0,001$).

2. Значимым для развития воспаления являются уровни гемоксигеназ:

НО-1 $>0,250$ нг/мл, отношение правдоподобия для положительного результата составляет 2,03 (чувствительность – 73,02%, специфичность – 64,00%, +PV – 83,60%; -PV – 48,50%);

НО-2 $>0,115$ нг/мл, отношение правдоподобия для положительного результата составляет 2,16 (чувствительность – 77,78%, специфичность – 64,00%, +PV – 84,50%; -PV – 53,30%) ($p = 0,001$).

Заключение

При использовании метода секвенирования 16spРНК установлен сложный и многокомпонентный состав микробиома эндометрия у пациенток с хроническим эндометритом. Повышение уровней НО-1 в крови $>0,250$ нг/мл, НО-2 $>0,115$ нг/мл является показанием для проведения противовоспалительной терапии.

Литература

1. Endometritis: new time, new concepts / K. Kitaya [et al.] // Fertility & Sterility. – 2018. – Vol.110, Issue 3. P. 344 – 350.
2. Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link / E. Cicinelli [et al.] // Fertility & Sterility. – 2017. – Vol. 108 (2). – P. 289–295.
3. Chronic endometritis in patients with unexplained infertility: Prevalence and effects of antibiotic treatment on

- spontaneous conception/E.Cicinelli [et al.]// American Journal of Reproductive Immunology. – 2018. – Vol. 79. – P. 12782.
4. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium/M. Benner [et al.]// Human Reproduction Update. – 2018. – Vol. 24, №4. – P. 393–415.
 5. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy/E. Cicinelli [et al.]// Human Reproduction. – 2015. – Vol. 30, №2. – P. 323–330.
 6. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium/M. Benner [et al.]// Human Reproduction Update. – 2018. – Vol. 24, №4. – P. 393–415.
 7. Лызикова, Ю.А. Микробиом полости матки у пациенток с хроническим эндометритом/Ю.А. Лызикова// Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2020. – №19 (6). – С. 79–85.
 8. Wu, B. Heme catabolic pathway in inflammation and immune disorders/B. Wu, Y. Wu, W. Tang// Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–15.
 9. HMOX1 as a marker of iron excess-induced adipose tissue dysfunction, affecting glucose uptake and respiratory capacity in human adipocytes/J. M. Moreno-Navarrete [et al.]// Diabetologia. – 2017. – Vol. 60. – P. 915–926.
 10. Heme oxygenase-1 deficiency presenting with interstitial lung disease and hemophagocytic flares/A.S. Chau [et al.]// Pediatric Rheumatology. – 2020. – Vol. 18. – P. 80–89.